

COPY OF PAPERS  
ORIGINALLY FILED

F-7323



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

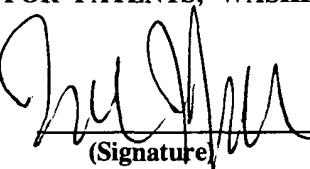
16142  
RECEIVED  
APR 25 2002  
37312  
TECH CENTER 1600/2900

Applicant : Shokyu GEN  
Serial No. : 10/085,555  
Filed : February 27, 2002  
For : A FORMATIVE AGENT OF PROTEIN COMPLEX  
Group Art Unit : (Not yet known)  
Examiner : (Not yet known)

Certificate of Mailing Under 37 CFR 1.8

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS, WASHINGTON, DC 20231 on April 11, 2002.

Frank J. Jordan  
(Name)

  
(Signature)

04/11/02

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

LETTER FORWARDING CERTIFIED PRIORITY DOCUMENT

Sir:

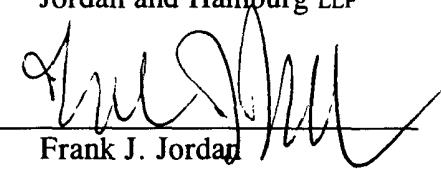
The above-identified application was filed claiming a right of priority based on applicant's corresponding foreign application as follows:

<u>Country</u>	<u>No.</u>	<u>Filing Date</u>
Japan	2001-107817	February 28, 2001

A certified copy of said document is annexed hereto and it is respectfully requested that this document be filed in respect to the claim of priority. The priority of the above-identified patent application is claimed under 35 U.S.C. § 119.

Respectfully submitted,

Jordan and Hamburg LLP

By 

Frank J. Jordan  
Reg. No. 20,456  
Attorney for Applicant

Jordan and Hamburg LLP  
122 East 42nd Street  
New York, New York 10168  
(212) 986-2340

FJJ/pb

Enc. Certified copy of Japanese Priority Document



日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

Jordan + Hamburg LSP  
F-7323  
S.N. 101085, 555  
Inventor: Shokyu GEN  
(212) 986-2340

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日  
Date of Application:

2001年 2月28日

出願番号  
Application Number:

特願2001-107817

[ST.10/C]:

[JP2001-107817]

出願人  
Applicant(s):

エム・ジー製薬株式会社

RECEIVED  
APR 25 2002  
TECH CENTER 1600/2900

2002年 3月22日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及川耕造

出証番号 出証特2002-3019502

【書類名】 特許願  
【整理番号】 MG-186  
【提出日】 平成13年 2月28日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【発明の名称】 蛋白質複合体形成剤  
【国際特許分類】 A61K6/00D7019-4C  
【請求項の数】 6  
【発明者】  
【住所又は居所】 京都府宇治市宇治御廟 29番地の13  
【氏名】 玄 丞然  
【特許出願人】  
【識別番号】 398056252  
【住所又は居所】 京都市南区東九条南松ノ木町45  
【氏名又は名称】 エム・ジー製薬株式会社  
【代表者氏名】 玄 洋子  
【提出物件の目録】  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 要 約 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 蛋白質複合体形成剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリフェノールが有効成分であり、遺伝子複合体、細胞接着抑制剤または免疫寛容剤として有効な蛋白質複合体形成剤。

【請求項2】 ポリフェノールの主成分が、エピガロカテキンガレート、タンニンまたはプロトシアニジンからなるカテキン類である請求項1に記載の蛋白質複合体形成剤。

【請求項3】 蛋白質複合体形成剤の蛋白質が、アミノ酸がペプチド結合したポリペプチド鎖からなる動物性蛋白質、植物性蛋白質、核蛋白質、糖蛋白質、リボ蛋白質および金属蛋白質からなる群より選ばれた蛋白質である請求項1に記載の蛋白質複合体形成剤。

【請求項4】 遺伝子複合体の複合体は動物や人の細胞に遺伝子類を導入するための複合体であって、ポリフェノールのカテキン類で遺伝子類を複合化することを特徴とする請求項1に記載の蛋白質複合体形成剤。

【請求項5】 細胞接着抑制剤の細胞が、人または動物から単離された胚性幹細胞、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、内分泌細胞、外分泌細胞、卵細胞、神経細胞、リンパ球、赤血球、血小板、骨髄細胞、軟骨細胞からなる群より選ばれた細胞である請求項1に記載の蛋白質複合体形成剤。

【請求項6】 免疫寛容剤が対象とする移植用の組織および臓器は、人および動物の組織および臓器である請求項1に記載の蛋白質複合体形成剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は蛋白質分子間の架橋、人または動物の細胞に対する細胞接着抑制剤および免疫寛容剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

一般に蛋白質は水溶性であるので、不溶化するために化学架橋剤処理や光、熱

架橋処理が行われている。ここで化学的架橋剤としてはグルタルアルデヒド等の二官能性の架橋剤がよく用いられている。また、トランスグルタミナーゼ、カルボジイミド、無水コハク酸、ヘキサメチレンジイソシアナート（特公平6-65280）、ペルオキシダーゼ（特開平11-75887）やマルチ銅オキシダーゼ（特開平11-276162）等の酵素を用いる蛋白質の架橋法が知られている。

#### 【0003】

しかし、これら蛋白質の化学的架橋剤は蛋白質を分子間の共有結合で架橋するため架橋構造が安定であり、生理活性を有する元の蛋白質には戻らなくなる。

#### 【0004】

一方、アレルギー反応、免疫反応、癌転移、動脈硬化あるいは各種の炎症反応等の疾患には、例えば白血球と血管内皮細胞、あるいは癌細胞と血管内皮細胞等の細胞間接着が共通して関与していることが分かってきた。

#### 【0005】

ウイルス感染や細菌感染等の刺激が生体に対して与えられると、様々な炎症反応が惹起されることにより、好中球、マクロファージ、あるいはT細胞等の白血球が炎症部位へ浸潤する。また、生体に異物が侵入すると生体自らの防御手段である免疫反応が生じ、そこに白血球が浸潤する。この際、白血球と血管内皮細胞は細胞表面に存在する特異な細胞接着分子を介して接着されると言われている。

#### 【0006】

これらの様々な接着分子は免疫応答の制御において重要な役割を果しているために、このような接着分子を介する細胞間接着、細胞間相互作用を制御し、炎症反応や免疫反応をコントロールする細胞接着抑制剤が知られている（特開平8-283151、特開平10-158184）。しかしながら、それらの効果は未だ満足できるものではない。

#### 【0007】

##### 【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明が解決しようとする課題は種々の蛋白質の生体に対して安全で、また可逆的な架橋剤として蛋白質系のサイトカイン類の徐放剤として、あるいは

は遺伝子導入のためのDNA複合体形成に安全で優れた効果をもつ蛋白質の架橋剤を提供することである。

## 【0008】

## 【課題を解決するための手段】

本発明によれば、ポリフェノールが有効成分であり、遺伝子複合体、細胞接着抑制剤または免疫寛容剤として有効な蛋白質複合体形成剤が提供される。

## 【0009】

本発明のポリフェノールは芳香族または脂環族にフェノール性水酸基が付加されているものなら特に限定はないが、特に好ましいものは種々の茶（緑茶、紅茶、ウーロン茶等）の主成分であるカテキン類、および種々の果実（葡萄、林檎、柿等）の主成分であるタンニンやプロアントシアニジン類である。

## 【0010】

これらは日常愛飲している緑茶や紅茶、さらに赤ワインに多く含有されている。例えば、緑茶から緑茶ポリフェノールを抽出するには、乾燥した緑茶の葉から水、エタノールまたは酢酸エチルなどの有機溶剤で抽出、生成するが、その主成分はエピガロカテキンガレート（EGCg）を主体とするカテキン類である。

## 【0011】

ポリフェノールは通常、純度60%以上の製品が入手可能である。本発明の蛋白質複合体形成剤には純度60%以上であれば仕様可能であるが、純度80%以上に精製されれば好ましい。ここで、高純度であればあるほど効果が著しく、特に医薬品として適用する場合には、EGCg、カテキン、エピガロカテキン等の純品を使用することが特に好ましい。

## 【0012】

この発明の遺伝子複合体は、動物や人の細胞に遺伝子類を導入するための複合体であって、ポリフェノールのカテキン類で遺伝子類を複合化することによって得られる。

## 【0013】

この発明の細胞接着抑制剤の細胞が、人または動物から単離された胚性幹細胞、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、内分泌細胞、外分泌細胞、卵細胞、神経細

胞、リンパ球、赤血球、血小板、骨髓細胞、軟骨細胞からなる群より選ばれた細胞である。また、これを使用する場合は、人や動物の種々の細胞や組織あるいは臓器に適用されている通常の細胞培養液や臓器保存液に、ポリフェノールを加えることによって、該細胞や細胞外マトリックスの表面に、簡単にポリフェノールを吸着させることができる。

#### 【0014】

この発明の免疫寛容剤が対象とする移植用の組織および臓器は、人および動物の組織および臓器である。

また、IgE抗体の関与する花粉症や喘息の患者に行うアレルギーの免疫法に用いる花粉症治療薬に応用できる。このアレルギーの免疫療法とは、微量のアレルゲンからはじめて、その量を漸増させて皮下注射することにより患者の症状を軽減させるもので、減感作療法と呼ばれている。さらに、肝炎やHIVワクチンにも応用できる。

#### 【0015】

蛋白質複合体形成剤の蛋白質は、アミノ酸がペプチド結合したポリペプチド鎖からなる動物性蛋白質、植物性蛋白質、核蛋白質、糖蛋白質、リボ蛋白質および金属蛋白質からなる群より選ばれた蛋白質である。好ましい態様として、蛋白質複合体形成剤を使用する場合、種々の蛋白質水溶液に攪拌下でポリフェノール水溶液を添加することにより、簡単に複合体が調整できる。

#### 【0016】

本発明の蛋白質複合体形成剤からなる徐放性医薬製剤には、ポリフェノール粉末に加えて、既存の抗炎症剤、抗アレルギー剤、抗ヒスタミン剤等を適宜、添加、組合せることができ、さらにアルブミンとか通常の賦形剤や添加剤などを加えることができる。

#### 【0017】

本発明の蛋白質複合体形成剤からなる徐放性医薬製剤の形状は、目的に応じて粉剤、錠剤、注射剤、ペースト、軟膏、坐薬等の形状をとることができ、さらに、他の抗酸化剤であるSOD、ビタミンE、Cおよびグルタチオン等も併用できる。

## 【0018】

本発明におけるポリフェノールによる蛋白質やDNAとの架橋反応機構は今のところ定かでないが、次のように推定している。ポリフェノールは抗酸化剤の一つとして良く知られているが、他の抗酸化剤には有しない特徴として、水にも油にも良くなじむ両親媒性を持っている点である。さらにもう一つの大きな特徴は蛋白質とのアフィニティーが極めて高い点にある。

## 【0019】

この蛋白質に対する高いアフィニティーはポリフェノールのフェノール性水酸基が蛋白質のアミノ基とのイオン結合および疎水性結合等によってバインディングするためであると考えられる。

## 【0020】

## 【作用】

ポリフェノールの免疫抑制作用機構は、細胞、組織および臓器をポリフェノールで処理することにより、それら細胞のレセプターおよび細胞外マトリックスにポリフェノールが容易にバインディングされ、生体の白血球と移植片の血管内皮細胞などの細胞接着を抑制することにより、生体が移植片を異物として認識されず、結果的に免疫拒絶反応が生じなくなるものと考えられる。

## 【0021】

本発明によれば、蛋白質やDNAにポリフェノールを添加することにより複合体が容易に調整でき、細胞接着反応の抑制、アレルギー反応および細胞接着の抑制ができる。詳しくは生体に安全なポリフェノールを用い、サイトカイン類や遺伝子、あるいは酵素類を可逆的に架橋することにより徐放性製剤として有用な蛋白質架橋剤を提供する。

## 【0022】

また、人や動物の細胞、組織ならびに臓器をポリフェノールで処理することにより、免疫抑制剤、癌転移抑制剤、抗アレルギー剤、抗炎症剤、慢性関節炎予防、治療剤および動脈硬化症予防、治療剤として有用な細胞抑制剤を提供する。さらに、微生物類にポリフェノールを添加することにより、微生物の長期間保存にも応用できる。

【0023】

### 【实施例】

【実施例】  
以下、本発明を実施例および比較例で詳述するが、本例示によって本発明は拘束されない。

[0024]

## 実施例 1

実施例 1  
 ブタインスリン (Sigma 製原末) 100 mg を 0.1 N HCl 10 ml に溶解した溶液に、室温でのマクネティックスターラーによる攪拌下で、予め生理食塩水に溶解したエピガロカテキンガレート (1 mg/ml) を 100  $\mu$ l 添加した。約 5 時間後、不溶解物が出現し、その溶液を凍結乾燥することによりインスリン複合体を回収した。インスリン複合体からインスリン溶出量をグルコースオキシダーゼ法 (酵素法) により測定した。インスリンは 1 日後に 18%、3 日後に 42%、そして 1 週間後には 93% が溶出した。

[0025]

### 比較例 1

比較例 1  
 プタインスリン (Sigma 製原末) 100 mg を 0.1 N HCl 10 ml に溶解した溶液に、室温でのマク、ネティックスターラーによる攪拌下で、タルアルデヒド水溶液を添加し、約 5 時間後凍結乾燥によりインスリン架橋物を回収した。インスリン架橋物からのインスリン溶出量測定を実施例 1 と同じ方法で測定したところ、1 週間後でもインスリンの溶出が全く認められなかった。

[0026]

## 実施例 2

実施例2  
 市販のインターフェロン $\alpha$   $1 \times 10^8$  unit を生理食塩水 10 ml に溶解し、室温でマグネットイックスターラーによる攪拌下、予め生理食塩水に溶解したエピガロカテキンガレート (1 mg / ml) を 100  $\mu$  l 添加した。約 8 時間後、凍結乾燥することによりインターフェロン複合体を回収した。インターフェロン複合体からのインターフェロン溶出量をダイナボット社製キットを使用しRIA法にて測定した。インターフェロンは 1 日後 6%、3 日後に 32%、そして 1 週間後に 87% 溶出した。

## 【0027】

比較例2

市販のインターフェロン $\alpha$   $1 \times 10^8$  unit を生理食塩水 10 ml に溶解し、室温でマグネティックスターラーによる攪拌下、予め生理食塩水に溶解したグルタルアルデヒド水溶液を  $100 \mu l$  添加した。約 8 時間後、凍結乾燥することによりインターフェロン架橋物を回収した。インターフェロン架橋物からのインターフェロン溶出量を実施例2と同じ方法で測定したところ 1 週間後でもインターフェロン溶出は全く認められなかった。

## 【0028】

実施例3

天然型ヒト上皮細胞成長因子（ヒトEGF、凍結乾燥品、大塚製薬社製）75  $0 \mu g$  を 5 ml の 0.1 N HCl に溶解した溶液を、室温でのマグネティックスターラーによる攪拌下で、予め生理食塩水に溶解したエピガロカテキンガレート（1 mg / ml）を  $50 \mu l$  添加した。約 5 時間攪拌後、凍結乾燥することによりEGF複合体を回収した。EGF複合体からのEGF溶出量をHPLCにて測定した。EGFは1日後に21%、3日後に45%、そして1週間後には97%が溶出した。

## 【0029】

比較例3

天然型ヒト上皮細胞成長因子（ヒトEGF、凍結乾燥品、大塚製薬社製）75  $0 \mu g$  を 5 ml の 0.1 N HCl に溶解した溶液を、室温でのマグネティックスターラーによる攪拌下で、グルタルアルデヒド水溶液を  $50 \mu l$  添加し、約 5 時間攪拌後、凍結乾燥によりEGF架橋体を回収した。EGF架橋体からのEGF溶出量を実施例3と同じ方法で測定したところ、1週間後でもEGFの溶出は全く認められなかった。

## 【0030】

実施例4

ラットの腹腔大動脈（直径約3 mm）を約4 cm 切除し、ポリフェノールを 1 mg / ml 添加したDMEM培養液に 24 時間 37°C に浸漬した。その血管を家

兎頸動脈への血管吻合により異種移植した。この移植を受けた家兎は2ヶ月以上生存し、血管造影により血流が認められた。さらに、移植2ヶ月後の移植血管の組織標本も正常な組織反応を示した。

## 【0031】

比較例4

ラットの腹腔大動脈（直径約3mm）を約4cm切除し、D MEM培養液に24時間37℃に浸漬した。その血管を家兎頸動脈への血管吻合により異種移植した。この移植を受けた家兎は2日後死亡した。摘出した移植血管内空は血栓が全面を覆っていた。

## 【0032】

実施例5

$\beta$  ガラクトシダーゼをレポーター遺伝子として持つプラスミドPLZRNのDNA  $30 \mu M$ を磷酸緩衝液（PBS（-））中に溶解したDNA溶液に、予めPBS（-）に溶解したエピガロカテキンガレート（1mg/ml）を $10 \mu l$ 添加した。約5時間攪拌後、凍結乾燥することによりDNA複合体を回収した。DNA複合体の細胞内でのDNA発現をラット線維芽細胞由来の接着細胞株208Fを用いて培養し、遺伝子導入量を発現した $\beta$  ガラクトシダーゼ活性として測定した。その結果、DNA-エピガロカテキンガレート複合体による $\beta$  ガラクトシダーゼ遺伝子の安定形質転換株は一過性発現に比べて非常に高い活性を示した。

## 【0033】

実施例6

スギ花粉より抽出・精製したアレルゲン蛋白質 $50 \text{ mg}$ を $10 \text{ ml}$ の生理食塩水に溶解した溶液にエピガロカテキンガレート（1mg/mg）を $100 \mu g$ 添加し、5時間攪拌した後、凍結乾燥によりアレルゲン蛋白質複合体を回収した。この複合体に対するラットのPK反応によってアレルゲン性を比較したところ、IgE抑制効果が認められた。

## 【0034】

## 【発明の効果】

本発明によれば、ポリフェノールのカテキン類を蛋白質の複合体形成剤として用いることにより、生理活性蛋白質であるサイトカイン類のドラッグデリバリー剤として有用である。また、DNAの複合体形成剤として用いることにより、種々の遺伝子類と再現性よく不溶性のDNA複合体を容易に形成でき、このDNA複合体は標的細胞に効率よく導入発現させることができる。そのため、遺伝子治療や有用物質産出のための細胞育種などに応用できる。また、ポリフェノールのカテキン類は優れた細胞接着抑制作用を持っているので、免疫抑制剤、抗アレルギー剤、癌転移抑制剤、点眼液、眼科用灌流液、抗炎症剤、動脈硬化症予防治療剤等の予防や治療に広範囲で使用することができる。また、種々の微生物類の療剤等の移植用の臍帯血、各種細胞、組織、長期間保存剤としても応用できる。さらに、移植用の臍帯血、各種細胞、組織、および臓器にも広く応用することができる。

【書類名】 要約書

【要約】

ポリフェノールが有効成分であり、遺伝子複合体、細胞接着抑制剤または免疫寛容剤として有効な蛋白質複合体形成剤。ここで、ポリフェノールの主成分が、エピガロカテキンガレート、タンニンまたはプロトシアニジンからなるカテキン類である。

本発明によれば、ポリフェノールのカテキン類を蛋白質の複合体形成剤として用いることにより、生理活性蛋白質であるサイトカイン類のドラッグデリバリー製剤として有用である。また、ポリフェノールのカテキン類は優れた細胞接着抑制作用を持っているので、免疫抑制剤、抗アレルギー剤、抗転移抑制剤、点眼液、眼科用灌流液、抗炎症剤、動脈硬化症予防治療剤等の予防や治療に広範囲で使用することができる。さらに、移植用の臍帯血、各種細胞、組織、および臓器にも広く応用することができる。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [398056252]

1. 変更年月日 1998年 8月21日

[変更理由] 新規登録

住 所 京都市南区東九条南松ノ木町45  
氏 名 エム・ジー製薬株式会社